

宫腔灌注 hCG 对反复种植失败及复发性流产患者外周血 Treg 的影响

邢俊,周建军,王俊霞,王玢,陈华,孙海翔*

(南京大学医学院附属鼓楼医院生殖医学中心,江苏 南京 210008)

[摘要] 目的:探讨宫腔灌注人绒毛膜促性腺激素(human chorionic gonadotropin,hCG)对外周血 Treg 细胞的调节作用,进而为反复种植失败(repeated implantation failure,RIF)及复发性流产(recurrent spontaneous abortion,RSA)患者宫腔灌注 hCG 治疗提供理论依据。方法:选择 2015 年 1—7 月在南京鼓楼医院生殖中心行辅助助孕 RIF 的患者 14 例、RSA 患者 16 例,于自然周期黄体中期行宫腔灌注 hCG。分别用流式细胞仪鉴定计数灌注前后的外周血 CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺Treg 细胞率。结果:宫腔灌注 hCG 后 RIF 组患者外周血中 Treg 的表达率[(2.26 ± 0.63)%]较灌注前[(1.72 ± 0.69)%]显著上升,差异有统计学意义($P < 0.05$);宫腔灌注 hCG 后 RSA 组患者外周血中 Treg 的表达率[(2.33 ± 0.56)%]较灌注前[(1.74 ± 0.62)%]显著上升,差异有统计学意义($P < 0.05$)。结论:宫腔灌注 hCG 能提高 RIF 及 RSA 患者种植窗期外周血 Treg 细胞百分比,诱导免疫耐受,促进胚胎植入,降低流产率。

[关键词] 反复种植失败;复发性流产;Treg;hCG

[中图分类号] R321.3

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2016)12-1443-03

doi:10.7655/NYDXBNS20161208

反复种植失败(repeated implantation failure,RIF)及复发性流产(recurrent spontaneous abortion,RSA)是困扰辅助生殖技术的一个难题,尤其是对胚胎质量好、子宫内膜正常者。近年来,国内外研究表明,不明原因 RIF 及 RSA 患者外周血 Treg 细胞数量下降^[1],宫腔灌注人绒毛膜促性腺激素(human chorionic gonadotropin,hCG)可以提高不明原因 RIF 患者的临床妊娠率,降低 RSA 患者流产概率^[2],但是具体机制不明。本研究通过观察 RIF、RSA 患者种植窗期 hCG 宫腔灌注后 Treg 细胞数量的变化,探讨 hCG 改变母胎界面免疫微环境,介导免疫耐受的机制,进而为 RIF、RSA 患者宫腔灌注 hCG 治疗提供理论依据。

1 对象和方法

1.1 对象

选择 2015 年 1—7 月在南京鼓楼医院生殖中心行辅助助孕 RIF 的患者 14 例、RSA 患者 16 例。RIF:本中心经过 3 个以上体外受精-胚胎移植(*in*

vitro fertilization-embryo transfer,IVF-ET)周期,移植良好胚胎未妊娠患者。RSA:连续发生 ≥ 2 次的早期自然流产。纳入条件:①年龄 23~40 岁;②基础卵泡刺激素(follicle-stimulating hormone,FSH) < 12 miu/mL, E₂ < 80 pg/mL;③经阴道 B 超证实双侧卵巢完整且无形态学异常;④甲状腺激素(TSH、FT3、FT4)、血糖及胰岛素等内分泌检查正常;⑤宫腔形态正常,无粘连、瘢痕;⑥自身免疫性抗体:抗心磷脂抗体、抗核抗体、抗甲状腺抗体、抗 β₂-糖蛋白 1 抗体阴性;⑦夫妻双方染色体正常。排除标准为:①子宫解剖畸形、子宫腔占位病变、输卵管积液;②黄体功能不全、多囊卵巢综合征、高泌乳素血症、甲状腺功能紊乱和糖尿病;③移植日子宫内膜厚度 < 7 mm;④遗传性易栓症。

1.2 方法

自然周期排卵后 7 d,用移植管宫腔灌注重组 hCG 500 IU,收集第 1 天清晨及 hCG 灌注后第 2 天清晨的空腹静脉血 3 mL,加入 EDTA 抗凝单个核细胞(peripheral blood mononuclear cell,PBMC)悬液,依次标记 anti-CD4-FITC 及 anti-CD25-APC 单抗(Affymetrix 公司,美国),室温避光温育,加入破膜剂,anti-Foxp 单抗,室温避光孵育完成染色,最后于流式细胞仪检测。将 CD4⁺T 细胞设门,以 Foxp3 为纵坐标,CD25 为横坐标圈出 CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺Treg 细胞群。检测 CD4⁺T 细胞亚群中 CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺

[基金项目] 国家自然科学基金青年科学基金项目(81200127);国家自然科学基金面上项目(81571504);江苏省社会发展科技计划项目(BL2014003);南京市医学科技发展项目(QYK10149);南京市卫生青年人才培养工程

*通信作者(Corresponding author),E-mail:stevensunz@163.com

细胞的百分比,间接反映 Treg 的细胞数目。

1.3 统计学方法

应用 SPSS13.0 统计学软件,计量指标经正态性检验后采用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组内灌注前后比较采用配对 *t* 检验, $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 RIF 患者 hCG 宫腔灌注前后外周血 Treg 变化

前期小样本试验中,使用流式检测并比较了 RIF 患者黄体中期宫腔灌注 hCG 后 1、2、3 d 外周血 Treg 细胞比例,结果显示宫腔灌注 hCG 后 1 d 外周血 hCG 上升最为显著。故本研究比较了 14 例 RIF 患者宫腔灌注前及宫腔灌注 hCG 后 1 d 的外周血 Treg 比例,发现其中 11 例宫腔灌注 hCG 后外周血 Treg 表达率显著上升。所有 14 例行配对 *t* 检验,结果显示,宫腔灌注 hCG 后 RIF 组患者外周血中 Treg 的表达率 [(2.26 ± 0.63)%] 较灌注前 [(1.72 ± 0.69)%] 显著上升,差异有统计学意义($P < 0.05$)。

2.2 RSA 患者 HCG 宫腔灌注前后外周血 Treg 变化

与 RIF 患者相似,在前期小样本试验中,使用流式检测并比较了 RSA 患者黄体中期宫腔灌注 hCG 后 1、2、3 d 外周血 Treg 细胞比例。结果显示 RSA 患者同样宫腔灌注 hCG 后 1 d 外周血 hCG 上升最为显著。本研究使用流式检测比较了 16 例 RSA 患者宫腔灌注前及宫腔灌注 hCG 后 1 d 的外周血 Treg 比例,发现 16 例中 14 例患者宫腔灌注 hCG 后外周血 Treg 表达率显著上升。对所有 16 例患者行配对 *t* 检验,结果显示,宫腔灌注 hCG 后 RSA 组患者外周血中 Treg 的表达率 [(2.33 ± 0.56)%] 较灌注前 [(1.74 ± 0.62)%] 显著上升,差异有统计学意义($P < 0.05$)。

3 讨论

据 Schumacher 等^[3]研究显示,母体“短时期”内出现的这种对胚胎显著免疫耐受、避免自身免疫疾病发生的能力,是以 CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺调节性 T 细胞出现在子宫内膜后获得的。它是一类具有免疫应答负调节功能的 CD4⁺T 淋巴细胞亚群,对机体维持外周 T 细胞内环境稳定和免疫耐受状态起着重要作用。早孕期子宫内膜及外周血 Treg 开始增多,中孕期达到高峰,产后迅速下降,其平衡失调可能造成妊娠失败^[4]。

体外 CD4⁺CD25⁺T 细胞可以抑制同种异体起反应的免疫细胞及其因子,Aluvihare 等^[5]将 BALB 小鼠和非同系小鼠交配,发现小鼠孕期外周血、脾脏

和腹股沟淋巴结、髂窝淋巴结中 CD4⁺CD25⁺T 细胞比例上升。当淋巴细胞缺乏 CD25 将导致小鼠胚胎的丢失,证实 CD4⁺CD25⁺Treg 细胞能够调节母胎免疫耐受。Shima 等^[6]研究发现在妊娠早期外周血和蜕膜中 CD4⁺CD25⁺T 细胞比例升高,CD4⁺CD25⁺T 细胞缺乏将失去免疫耐受导致流产。在 Treg 细胞缺乏症动物模型,引起胚胎植入的失败和自然流产,Treg 细胞低水平与流产有关。最近研究表明,极早期植入排斥和流产倾向小鼠显示 CD4⁺CD25⁺Treg 不足。

低表达的 CD4⁺CD25⁺Treg 与人类 RSA 产具有相关性^[7]。研究显示,相较于对照组,RSA 女性外周血及蜕膜中 CD4⁺CD25⁺Treg 明显减少^[8]。Sasaki 等^[9]发现早孕妇女蜕膜含有丰富的 CD4⁺CD25⁺Treg。相较于人工流产组,自然流产女性蜕膜中 CD4⁺CD25⁺Treg 的含量明显降低。此外,较正常妊娠妇女,原因不明的不孕症妇女黄体中期子宫内膜组织中 Foxp3 mRNA 表达明显减少,进一步表明 Foxp3 在黄体中期子宫内膜表达降低可能与不孕症有关^[10]。Zhon 等^[11]证明 IVF 患者血中的 Treg 水平与 IVF 妊娠结局呈相关性。以上研究均提示 Treg 细胞在妊娠母胎界面免疫调节中发挥重要作用。

最近研究表明,胚胎移植前宫腔内灌注 hCG 可显著提高初次接受 IVF 患者移植后的种植率和妊娠率^[12],但其具体作用机制尚不清楚。在小鼠模型中研究发现,腹腔注射 hCG 会升高非孕鼠及孕鼠子宫中 Treg 表达上升。但仅当妊娠继续时,系统 Treg,即血、胸腺、淋巴结中的 Treg 才会继续上升,而非孕鼠不会上升。此外,腹腔注射 hCG 会显著降低自然流产小鼠模型的流产率。Zenclussen 等^[13]将 hCG 诱导的孕鼠的 Treg 细胞转移至怀孕 0~2 d 的流产模型孕鼠中,发现完全防止复发性流产。hCG 作为最早出现的胚胎源性物质信号(受精后即开始分泌,而且有化学趋化性)可促进 Treg 在母胎界面聚集,诱导 Treg 介导的母胎免疫耐受和胚胎种植。但机制尚未明确^[14]。

本研究中,比较了 14 例 RIF 患者及 16 例 RSA 患者宫腔灌注前及宫腔灌注 hCG 后 1 d 的外周血 Treg 比例,结果发现,RIF 及 RSA 患者宫腔灌注 hCG 后外周血 Treg 表达率显著上升。证实宫腔灌注 hCG 能提高反复种植失败及复发性流产患者种植窗期外周血 Treg 细胞百分比,诱导 CD4⁺CD25⁺Treg 细胞是机体以主动方式获得和维持自身耐受的一种重要的免疫细胞。CD4⁺CD25⁺Treg 细胞的发育受转录因子 Foxp3 调控。特征是组成性表达 IL-2 受体

的 α 链分子(CD25)和Foxp3。调节型T细胞因子转化生长因子根据来源不同,Treg分为天然型Treg(nTreg)和诱导型Treg(iTreg)两大类;nTreg在胸腺产生后进入外周血液循环,监控全身免疫平衡;iTreg在特定的免疫微环境下由外周组织CD4⁺CD25⁻T细胞诱导分化而来,与nTreg具有相同的表面标记和功能^[15]。T细胞受体(TCR)、白细胞介素2(IL-2)和转化生长因子- β (TGF- β)刺激是诱导Treg分化的必要因素,IL-2在TGF- β 诱导CD4⁺CD25⁻T分化为CD4⁺CD25⁺T,并且表达Foxp3的过程中是非常必要的^[16]。TGF- β 、IL-2调节辅助性T细胞的分化,参与机体的免疫应答和免疫耐受。超表达hCG小鼠的TGF- β 1表达较对照小鼠高。体外实验证实,hCG可以促进颗粒细胞分泌IL-2,并且呈剂量依赖型^[17]。子宫内膜间质细胞能合成、分泌细胞因子和功能蛋白TGF- β 1,在局部发挥自分泌、旁分泌作用,参与调节子宫内膜生长、分化。TGF- β 1早、中增生期间质细胞大多无表达或弱阳性,晚增生期及中分泌期间质细胞表达丰富,在晚分泌期表达强度较中分泌期相比下降^[18]。此外,TGF- β 会促进滋养层细胞的侵袭。因此,宫腔内灌注hCG后,可能促进子宫间质细胞分泌IL-2、TGF- β ,以旁分泌形式作用于Treg细胞的表面受体而发挥作用,增强Treg细胞比例,进而增强母-胎间的免疫耐受,增强子宫内膜容受性。目前,本课题组正同步深入研究其机制。

[参考文献]

[1] 王莲莲,曹霞,施展. 复发性自然流产妇女外周血调节性T细胞和辅助性T细胞水平的表达[J]. 中国妇幼保健,2011,23(7):1068-1070

[2] Cole LA. hCG and hyperglycosylated hCG in the establishment and evolution of hemochorial placentation [J]. J Reprod Immunol,2009,82(2):112-118

[3] Schumacher A, Costa SD, Zenclussen AC. Endocrine factors modulating immune responses in pregnancy [J]. Front Immunol,2014,5:196

[4] Somerset DA, Zheng Y, Kilby MD, et al. Normal human pregnancy is associated with an elevation in the immune suppressive CD25⁺CD4⁺ regulatory T-cell subset [J]. Immunology,2004,112(1):38-43

[5] Aluvihare VR, Kallikourdis M, Betz AG. Regulatory T cells mediate maternal tolerance to the fetus [J]. Nat Immunol,2004,5(3):266-271

[6] Shima T, Sasaki Y, Itoh M, et al. Regulatory T cells are necessary for implantation and maintenance of early pregnancy but not late pregnancy in allogeneic mice [J].

J Reprod Immunol,2010,85(2):121-129

[7] Saito S, Shima T, Nakashima A, et al. What is the role of regulatory T cells in the success of implantation and early pregnancy [J]. J Assist Reprod Genet,2007,24(9):379-386

[8] Bour-Jordan H, Bluestone JA. Regulating the regulators: costimulatory signals control the homeostasis and function of regulatory T cells [J]. Immunol Rev,2009,229(1):41-66

[9] Sasaki Y, Sakai M, Miyazaki S, et al. Decidual and peripheral blood CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells in early pregnancy subjects and spontaneous abortion cases [J]. Mol Hum Reprod,2004,10(5):347-353

[10] Jasper MJ, Tremellen KP, Robertson SA. Primary unexplained infertility is associated with reduced expression of the T-regulatory cell transcription factor Foxp3 in endometrial tissue [J]. Mol Hum Reprod,2006,12(5):301-308

[11] Zhou J, Wang Z, Zhao X, et al. An increase of Treg cells in the peripheral blood is associated with a better in vitro fertilization treatment outcome [J]. Am J Reprod Immunol,2012,68(2):100-106

[12] Mansour R, Tawab N, Kamal O, et al. Intrauterine injection of human chorionic gonadotropin before embryo transfer significantly improves the implantation and pregnancy rates in *in vitro* fertilization/intracytoplasmic sperm injection: a prospective randomized study [J]. Fertil Steril,2011,96(6):1370-1374.e1

[13] Zenclussen AC, Gerlof K, Zenclussen ML, et al. Regulatory T cells induce a privileged tolerant microenvironment at the fetal-maternal interface [J]. Eur J Immunol,2006,36(1):82-94

[14] Schumacher A, Heinze K, Witte J, et al. Human chorionic gonadotropin as a central regulator of pregnancy immune tolerance [J]. J Immunol,2013,190(6):2650-2658

[15] Campbell DJ, Koch MA. Phenotypical and functional specialization of FOXP3⁺ regulatory T cells [J]. Nat Rev Immunol,2011,11(2):119-130

[16] Zheng SG, Wang J, Wang P, et al. Horwitz DA. IL-2 is essential for TGF-beta to convert naive CD4⁺CD25⁻ cells to CD25⁺Foxp3⁺ regulatory T cells and for expansion of these cells [J]. J Immunol,2007,178(4):2018-2027

[17] Orvieto R, Dratviman-Storobinsky O, Cohen Y. Interleukin-2 production by cultured human granulosa cells [J]. Am J Reprod Immunol,2015,74(5):392-397

[18] 魏兆莲,陈咏健. TGF β I及其受体在子宫内膜和早孕蜕膜中的表达及意义 [J]. 中国妇产科临床,2003,4(4):295-297